

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-080185

(43)Date of publication of application : 26.03.1999

(51)Int.Cl. C07H 1/00

C07D233/58

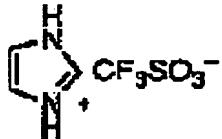
C07H 21/00

// C07D235/08

(21)Application number : 09-241292 (71)Applicant : RES DEV CORP OF JAPAN

(22)Date of filing : 05.09.1997 (72)Inventor : HAYAKAWA YOSHIHIRO
KATAOKA MASANORI

(54) CHEMICAL SYNTHESIS OF OLIGONUCLEOTIDE



(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for chemically synthesizing a long chain oligonucleotide comprising ≥ 100 nucleotide units, enabling to simply and surely chemically synthesize the oligonucleotide, and to provide a new compound to be used for the method.

SOLUTION: This method for chemically synthesizing an oligonucleotide comprising a prescribed base sequence by a phosphoramidate method comprises preparing a basic portion-nonprotected nucleoside phosphoramidate from a basic portion-nonprotected nucleoside by the use of

imidazole trifluoromethanesulfonate expressed by the below-described chemical formula and subsequently coupling the molecules of the prepared basic portion-nonprotected nucleosidephosphoramidate in a prescribed order.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 24.03.2003

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

*** NOTICES ***

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

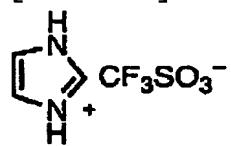
- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
 - 2.**** shows the word which can not be translated.
 - 3.In the drawings, any words are not translated.
-

CLAIMS

[Claim(s)]

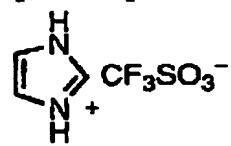
[Claim 1] How to carry out chemosynthesis of the oligonucleotide which consists of a predetermined base sequence by preparing salt base non-protected nucleoside phosphoroamidite from salt base a non-protected nucleoside in the chemosynthesis of the oligonucleotide by the phosphoroamidite method using the trifluoro methansulfonic acid salt of the imidazole expressed with the following chemical formulas, and carrying out coupling of this salt base non-protected nucleoside phosphoroamidite in predetermined sequence.

[Formula 1]



[Claim 2] The approach of claim 1 which processes the salt base non-protected nucleoside phosphoroamidite by which coupling was carried out with the trifluoro methansulfonic acid salting in liquid of the benzimidazole.

[Claim 3] The following chemical formula [** 2]



The trifluoro methansulfonic acid salt of the imidazole come out of and expressed.

[Translation done.]

* NOTICES *

JPO and NCIPI are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
 2. **** shows the word which can not be translated.
 3. In the drawings, any words are not translated.
-

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

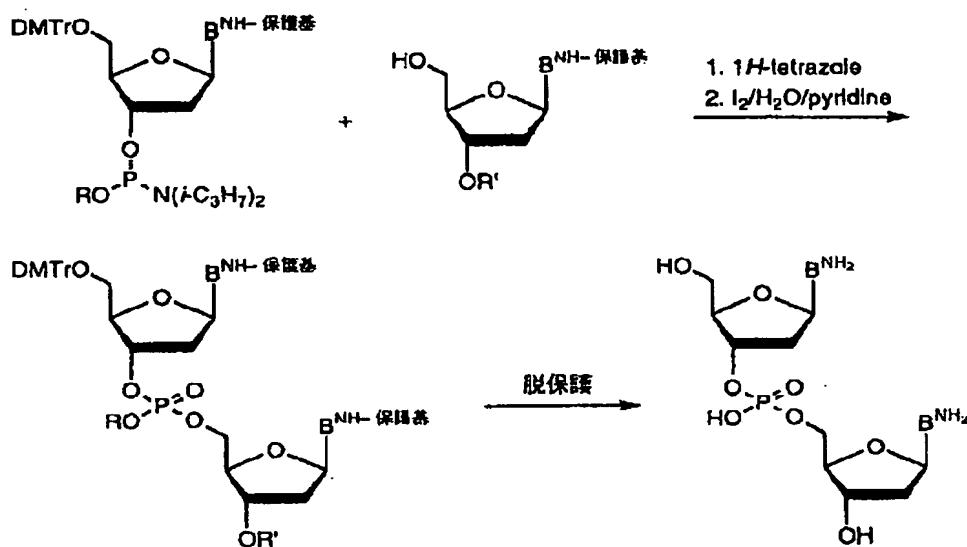
[Field of the Invention] Invention of this application relates to the chemosynthesis method of an oligonucleotide. Invention of this application relates to the new molecular entity used for the new approach of carrying out chemosynthesis of a long-chain DNA fragment or a long-chain RNA fragment simple and certainly by making salt base non-protected nucleoside phosphoroamidite into a configuration unit, and this approach in more detail.

[0002]

[Description of the Prior Art] as the approach of compounding the oligonucleotide of a DNA fragment or RNA fragment sugar chemically -- the phosphoroamidite method (Nucleic Acids Research, 17, 7059-7071, 1989) -- current -- but it is used widely. Generally the condensation reaction of the nucleoside phosphoroamidite which made tetrazole the accelerator, and a nucleoside is used for this phosphoroamidite method as a key reaction. Although this reaction usually occurs competitively in both the hydroxyl group for a sugar part, and the amino group of the nucleoside base section, it needs to make only the hydroxyl group for a sugar part cause a reaction alternatively for desired nucleotide composition. Therefore, he was trying to prevent the side reaction to the amino group by protecting the amino group, as the reaction formula was illustrated below conventionally.

[0003]

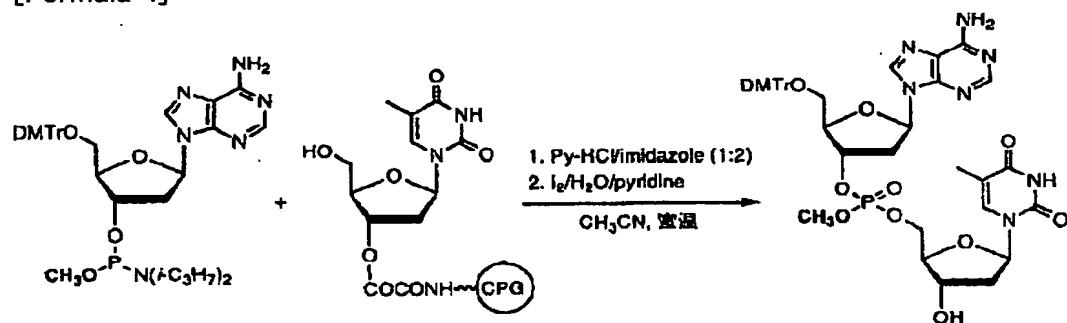
[Formula 3]



[0004] However, although the protective group had to be removed at the time of synthetic termination, since a complicated organic reaction and an expensive and harmful reagent were needed in large quantities operationally, installation and removal of this protective group had become a big trouble at the time of enforcing this approach in respect of practicality, economical efficiency, environmental preservation, etc. for this reason, Letsinger as the chemosynthesis approach of the oligonucleotide which makes a configuration unit the nucleoside phosphoroamidite which does not protect the amino group is desired and showed the reaction formula below as that pioneering thing etc. -- approach (Nucleic Acids Research, 20, 1879–1882, 1992) It is known.

[0005]

[Formula 4]



[0006]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] however, this Letsinger etc. -- in the case of an approach (1) Since condensation yield of each step cannot apply to a

commercial automatic DNA synthesizer low (99% or more of yield is required of composition of the long-chain oligonucleotide of about 97% : 50 or more ****s also at the lowest), (2) which cannot compound long-chain oligonucleotides, such as 50 generally demanded by chemosynthesis, such as DNA, - 100 ****, since only reactant specific high nucleoside phosphoroamidite can be used, (3) which applicability is narrow and lacks in practicality its moistness is very high, and since the pyridine hydrochloride used as an accelerator is an unstable compound, it is difficult handling -- etc. -- there is a fault, practicality and generality are missing and the actual condition is not used in fact.

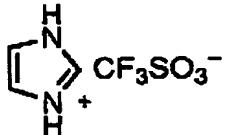
[0007] Invention of this application is made in view of the situation of the conventional technique as above, and aims at offering the new molecular entity used for the practical approach of carrying out chemosynthesis of the long-chain oligonucleotide of 100 or more ****s simple and certainly, and this approach.

[0008]

[Means for Solving the Problem] This invention offers the approach of carrying out chemosynthesis of the oligonucleotide which consists of a predetermined base sequence as what solves the above-mentioned technical problem by preparing salt base non-protected nucleoside phosphoroamidite from salt base a non-protected nucleoside using the trifluoro methansulfonic acid salt of the imidazole expressed with the following chemical formulas in the chemosynthesis of the oligonucleotide by the phosphoroamidite method, and carrying out coupling of this salt base non-protected nucleoside phosphoroamidite in predetermined sequence.

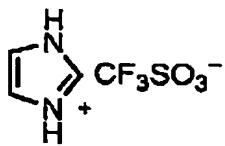
[0009]

[Formula 5]



[0010] Moreover, by the above-mentioned approach of this invention, it requires also as a desirable mode processing the salt base non-protected nucleoside phosphoroamidite by which coupling was carried out with the trifluoro methansulfonic acid salting in liquid of the benzimidazole. Furthermore, this invention is the following chemical formula [0011].

[Formula 6]



[0012] It comes out and the trifluoro methansulfonic acid salt of the imidazole expressed is also offered. The artificer of this application etc. namely, as a condensation reaction accelerator of nucleoside phosphoroamidite and a nucleotide The trifluoro methansulfonic acid salt of the imidazole which is a new molecular entity instead of the tetrazole used conventionally The salt base non-protected nucleoside phosphoroamidite which used (it is hereafter indicated as imidazolium truffe RATO), and was prepared The side reaction to the nucleoside base section amino group did not occur, complicated actuation of installation of a protective group, removal, etc. was not needed, but invention of a header lever was completed for the ability of that composition to carry out with a commercial DNA synthesis machine moreover. Furthermore, when the artificer of this application etc. did coupling of the above-mentioned salt base non-protected nucleoside phosphoroamidite and he processed by the methanol solution of the trifluoro methansulfonic acid salt (it is hereafter indicated as BENSU imidazolium truffe RATO) of a BENSU imidazole, the side reaction to the base section amino group was suppressed completely, and he found out that a more perfect oligonucleotide was compounded, and completed this invention.

[0013] Hereafter, the gestalt of implementation of this invention is explained in detail.

[0014]

[Embodiment of the Invention] Imidazolium truffe RATO of this invention can be prepared by mixing an imidazole and trifluoro methansulfonic acid to 1:1Eq among dichloromethane, as that example of preparation was shown in the below-mentioned example 1. Thus, as shown also in the example 1, obtained imidazolium truffe RATO does not have hygroscopicity, either, by the anticipated-use environment condition, is very stable and can be dealt with easily.

[0015] In the chemosynthesis approach of this invention, chemosynthesis of the oligonucleotide which consists of a predetermined base sequence is carried out by preparing salt base non-protected nucleoside phosphoroamidite from salt base a non-protected nucleoside using imidazolium truffe RATO as above-mentioned, carrying out a construction unit for this salt base non-protected nucleoside phosphoroamidite, and carrying out coupling of each in predetermined sequence.

[0016] Salt base non-protected nucleoside phosphoroamidite can be prepared by

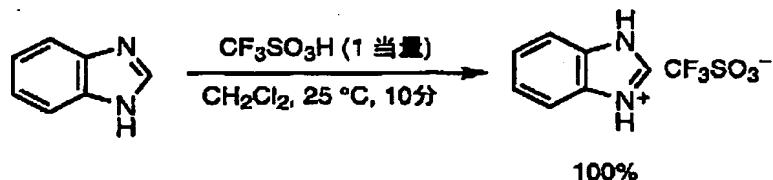
using imidazolium truffe RATO for a catalyst and making salt base a non-protected nucleoside react with cyano ethyl screw AMIDAITO, as illustrated in the below-mentioned example 2. In this case, since a reaction occurs in the sugar part hydroxyl group of a nucleoside alternatively, four kinds of N-non-protected nucleoside phosphoroamidite used for DNA synthesis, i.e., a deoxyadenosine, a deoxythymidine, deoxyguanosine, and thymidine phosphoroamidite can be obtained quantitatively.

[0017] The oligonucleotide which consists of a desired base sequence is compoundable with a well-known solid phase synthesis method etc. by making into a configuration unit four kinds of N-non-protected nucleoside phosphoroamidite obtained as above. Moreover, this synthetic reaction can also be performed according to that protocol using a commercial DNA synthesis machine. furthermore, every which carried out coupling by the approach of this invention -- it is desirable to boil N-non-protected nucleoside phosphoroamidite each time, and to process it with the solution (for example, ethanol solution) of bends imidazolium truffe RATO. The side reaction to the base section amino group is suppressed completely, and a more highly complete oligonucleotide is compounded by this processing.

[0018] In addition, bends imidazolium truffe RATO is compoundable with the following reaction formulae.

[0019]

[Formula 7]



[0020] Hereafter, an example is shown, and about invention of this application, further, although explained concretely, this invention is not a detail and the thing limited by the following examples.

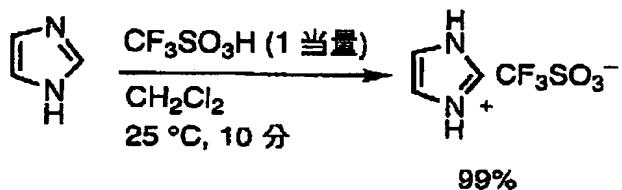
[0021]

[Example]

Example 1: As that reaction formula was shown below in preparation of imidazolium truffe RATO, imidazolium truffe RATO of this invention was prepared by mixing to 1:1Eq among dichloromethane and making an imidazole and trifluoro methansulfonic acid react for 10 minutes at 25 degrees C.

[0022]

[Formula 8]



[0023] Obtained imidazolium truffe RATO had the property as shown in Table 1 as a result of analysis by the well-known approach.

[0024]

[Table 1]

無色結晶

融点 197-198 °C

元素分析 計算値： $\text{C}_4\text{H}_5\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$:

C, 22.02; H, 2.31; N, 12.84

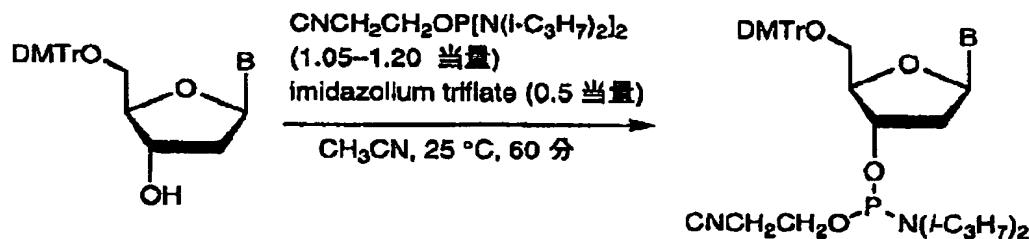
実測値： C, 21.96; H, 2.30; N, 12.74

吸湿性なし

[0025] Example 2: Imidazolium truffe RATO obtained in the example 1 was used for the catalyst, and the salt base non-protected nucleoside was made to react with cyano ethyl screw AMIDAITO, as the reaction formula was shown below in preparation of salt base non-protected nucleoside phosphoroamidite.

[0026]

[Formula 9]



[0027] By this reaction, four kinds of N-non-protected nucleoside phosphoroamidite shown in Table 2, i.e., a deoxyadenosine, a deoxythymidine, deoxyguanosine, and thymidine phosphoroamidite were prepared respectively. As shown also in Table 2, each nucleoside phosphoroamidite was obtained almost quantitatively.

[0028]

[Table 2]

B:				
yield, %:	96	98	97	99
purity, %:	>98	>98	>96	>99
³¹ P NMR, ppm:	149.0, 149.1	149.2, 149.3	149.1, 149.2	149.0, 149.1

[0029] Example 3: The DNA fragment of 60 **** which showed the base sequence to the array number 1 was compounded with the solid phase synthesis method using a commercial DNA synthesis machine by making into a configuration unit four kinds of N-non-protected nucleoside phosphoroamidite obtained in the synthetic example 3 of a DNA fragment. In addition, the reaction cycle was considered as the passage of Table 3.

[0030]

[Table 3]

step	operation	reagent (s)	time, min
1	washing	CH ₃ CN	0.50
2	detritylation	3% CCl ₃ COOH/CH ₂ Cl ₂	1.0 x 3
3	washing	CH ₃ CN	2.0
4	coupling	0.1 M amidite /CH ₃ CN + 0.1 M IMT/CH ₃ CN	0.25
5	wait		1.0
6	N-P cleavage	0.3 M BIT/CH ₃ CN	0.50
7	wait		2.0
8	washing	CH ₃ CN	0.50
9	oxidation	1 M t-C ₄ H ₉ OOH/CH ₂ Cl ₂	0.25
10	wait		1.0

BIT = benzimidazolium triflate; IMT = imidazolium triflate

[0031] In this synthetic reaction, each step (condensation reaction) in chain length expanding as shown in drawing 1 advanced at about 100%, and phosphoric-acid section protection 60 **** was usually obtained at 100% of yield. This yield was very efficient when it took into consideration that the synthetic yield of 60 **** in the conventional method currently performed on the current general target was about 20 – 40%. Furthermore, as shown in drawing 2, non-protected DNA60 **** was obtained

with quantitative yield by performing deprotection and an elimination reaction by ammonia liquor processing (for 25 degrees C and 60 minutes).

[0032] moreover, when [which consists of conditions which showed the crude extract of obtained non-protected DNA60 **** in Table 4] it came out and high performance chromatography analyzed, as shown in drawing 3, the purity was 95% or more.

[0033]

[Table 4]

分析条件	
カラム	DEAE-2.5μ (250 mm)
流速	0.5 mL/min
温度	25 °C
溶出液	A: 20mM Tris-HCl (pH 9.0) B: A + 1 M NaCl
勾配	A: B (100:0)→(50:50) linear gradient

[0034]

[Effect of the Invention] The oligonucleotide synthesis method characterized by using imidazolium truffe RATO which is the new molecular entity of this invention, and this imidazolium truffe RATO has the advantage as follows as explained in detail above.

(1) Composition of long-chain oligonucleotides, such as 50 as which it is generally required by chemosynthesis, such as DNA, since the condensation yield of each step can apply also to a commercial automatic DNA synthesizer only by modification of the reagent used [which use it, and is as expensive as 100% and composition-programs] – 100 ****, is possible at 1/10 or less cost of the conventional approach.

(2) Since unspecified nucleoside phosphoroamidite can be used, applicability is wide and practical.

(3) Imidazolium truffe RATO of this invention used as an accelerator does not have hygroscopicity, either, and since it is a stable compound, the handling by the busy condition is usually very easy for it.

[0035]

[Layout Table]

array number: -- die-length [of one array]: -- mold [of 60 arrays]: -- number [of nucleic-acid chains]: -- single strand topology: -- nucleic acid besides class: of a straight chain-like array Synthetic DNA array TATGGGCCTT TTGATAGGAT GCTCACCGAG CAAAACCAAG AACAAACCAGG AGATTTTATT 60

[Translation done.]

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平11-80185

(43)公開日 平成11年(1999)3月26日

(51)Int.Cl.⁶
C 07 H 1/00
C 07 D 233/58
C 07 H 21/00
// C 07 D 235/08

識別記号

F I
C 07 H 1/00
C 07 D 233/58
C 07 H 21/00
C 07 D 235/08

審査請求 未請求 請求項の数3 O L (全 6 頁)

(21)出願番号 特願平9-241292

(22)出願日 平成9年(1997)9月5日

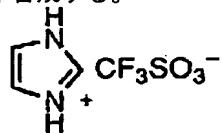
(71)出願人 396020800
科学技術振興事業団
埼玉県川口市本町4丁目1番8号
(72)発明者 早川 芳宏
愛知県一宮市浅井町小日比野上牧121
(72)発明者 片岡 正典
愛知県名古屋市天白区井口二丁目208 ミ
ヤタビル202
(74)代理人 弁理士 西澤 利夫

(54)【発明の名称】オリゴヌクレオチドの化学合成法

(57)【要約】 (修正有)

【課題】 100量体以上の長鎖オリゴヌクレオチドを簡便かつ確実に化学合成することのできる実用的な方法と、この方法に用いる新規化合物を提供する。

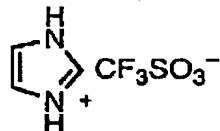
【解決手段】 ホスホロアミダイト法によるオリゴヌクレオチドの化学合成において、下記の化学式で表されるイミダゾールのトリフルオロメタンスルホン酸塩を用いて塩基部無保護ヌクレオシドから塩基部無保護ヌクレオシドホスホロアミダイトを調製し、この塩基部無保護ヌクレオシドホスホロアミダイトを所定の順番でカップリングすることにより、所定の塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを化学合成する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 ホスホロアミダイト法によるオリゴヌクレオチドの化学合成において、以下の化学式で表されるイミダゾールのトリフルオロメタンスルホン酸塩を用いて塩基部無保護ヌクレオシドから塩基部無保護ヌクレオシドホスホロアミダイトを調製し、この塩基部無保護ヌクレオシドホスホロアミダイトを所定の順番でカップリングすることにより、所定の塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを化学合成する方法。

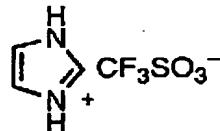
【化1】



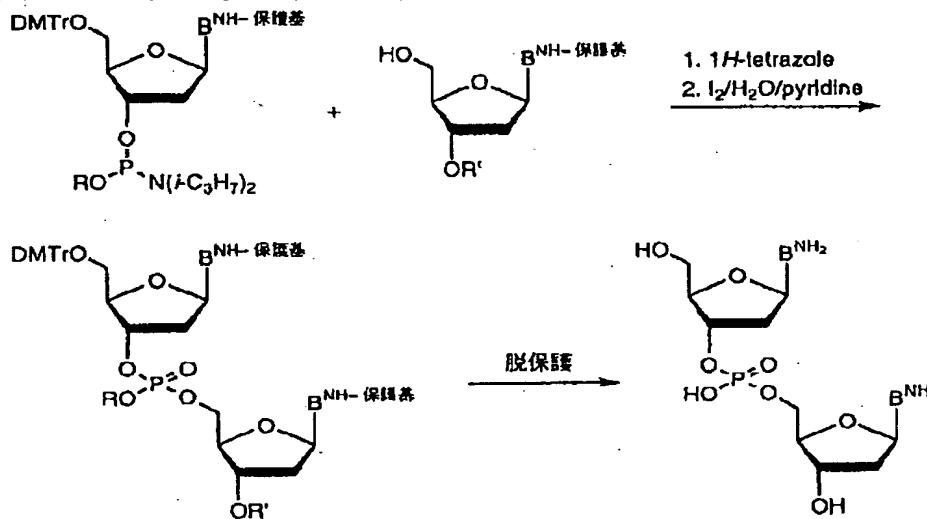
【請求項2】 カップリングされた塩基部無保護ヌクレオシドホスホロアミダイトを、ベンズイミダゾールのトリフルオロメタンスルホン酸塩溶液で処理する請求項1の方法。

【請求項3】 次の化学式

【化2】



で表されるイミダゾールのトリフルオロメタンスルホン



【0004】しかしながら、保護基は合成終了時には除去しなければならないが、この保護基の導入および除去は、操作的に煩雑な有機反応や高価で有害な試薬を大量に必要とするため、実用性、経済性、環境保全等の点でこの方法を実施する際の大きな問題点となっていた。このため、アミノ基を保護しないヌクレオシドホスホロアミダイトを構成単位とするオリゴヌクレオチドの化学合

酸塩。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】この出願の発明は、オリゴヌクレオチドの化学合成法に関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、塩基部無保護ヌクレオシドホスホロアミダイトを構成単位として、長鎖のDNA断片またはRNA断片を簡便かつ確実に化学合成することができる新規な方法と、この方法に用いる新規化合物に関するものである。

【0002】

【従来の技術】DNA断片やRNA断片糖のオリゴヌクレオチドを化学的に合成する方法としては、ホスホロアミダイト法(Nucleic Acids Research, 17, 7059-7071, 1989)が現在もっとも汎用されている。このホスホロアミダイト法は、一般的には、テトラゾールを促進剤としたヌクレオシドホスホロアミダイトとヌクレオシドの縮合反応を鍵反応として用いている。この反応は、通常、糖部分の水酸基とヌクレオシド塩基部のアミノ基の両方に競合的に起こるが、所望のヌクレオチド合成のために糖部分の水酸基にのみ選択的に反応を起こさせる必要がある。従って、従来は、以下に反応式を例示したように、アミノ基を保護することでアミノ基への副反応を防止するようになっていた。

【0003】

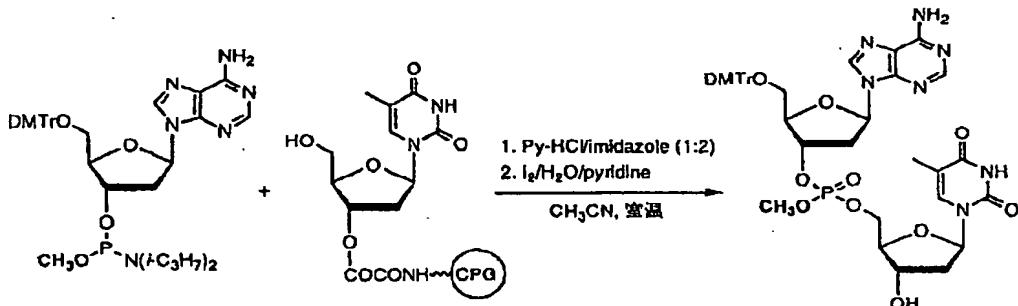
【化3】

成方法が望まれており、その先駆的なものとしては、以下に反応式を示したようなLetsinger等の方法(Nucleic Acids Research, 20, 1879-1882, 1992)が知られている。

【0005】

【化4】

(3)



【0006】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、このLe tsinger 等の方法の場合には、(1) 各ステップの縮合収率が低く(97%程度: 50量体以上の長鎖オリゴヌクレオチドの合成には最低でも99%以上の収率が要求される)、また市販の自動DNA合成装置には適用できなかったため、DNA等の化学合成で一般に要求される50~100量体といった長鎖オリゴヌクレオチドの合成が不可能である、(2) 反応性の高い特定のヌクレオシドホスホロアミダイトしか使用できないため、適用範囲が狭く、実用性に欠ける、(3) 促進剤として使用するピリジン塩酸塩は極めて保湿性が高く、不安定な化合物であるため、取り扱いが困難である等の欠点があり、実用性、一般性に欠け、実際には使用されていないのが実状である。

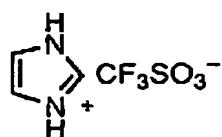
【0007】この出願の発明は、以上のとおりの従来技術の事情に鑑みてなされたものであり、100量体以上の長鎖オリゴヌクレオチドを簡便かつ確実に化学合成することのできる実用的な方法と、この方法に用いる新規化合物を提供することを目的としている。

【0008】

【課題を解決するための手段】この発明は、上記の課題を解決するものとして、ホスホロアミダイト法によるオリゴヌクレオチドの化学合成において、以下の化学式で表されるイミダゾールのトリフルオロメタンスルホン酸塩を用いて塩基部無保護ヌクレオシドから塩基部無保護ヌクレオシドホスホロアミダイトを調製し、この塩基部無保護ヌクレオシドホスホロアミダイトを所定の順番でカップリングすることにより、所定の塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを化学合成する方法を提供する。

【0009】

【化5】

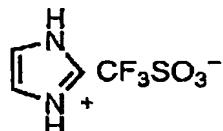


【0010】また、この発明の上記方法では、カップリングされた塩基部無保護ヌクレオシドホスホロアミダイトを、ベンズイミダゾールのトリフルオロメタンスルホ

ン酸塩溶液で処理することを好ましい態様としてもいる。さらにこの発明は、次の化学式

【0011】

【化6】



【0012】で表されるイミダゾールのトリフルオロメタンスルホン酸塩をも提供する。すなわち、この出願の発明者等は、ヌクレオシドホスホロアミダイトとヌクレオチドとの縮合反応促進剤として、従来用いられていたテトラゾールの代わりに新規化合物であるイミダゾールのトリフルオロメタンスルホン酸塩（以下、イミダゾリウムトリフラーートと記載する）を用いて調製した塩基部無保護ヌクレオシドホスホロアミダイトは、ヌクレオシド塩基部アミノ基への副反応が起ららず、その結果、保護基の導入、除去等の煩雑な操作を必要とせず、しかもその合成が市販のDNA合成機で実施可能であることを見出してこの発明を完成させた。さらにこの出願の発明者等は、上記の塩基部無保護ヌクレオシドホスホロアミダイトをカップリングした際に、ベンズイミダゾールのトリフルオロメタンスルホン酸塩（以下、ベンズイミダゾリウムトリフラーートと記載する）のメタノール溶液で処理すると、塩基部アミノ基への副反応が完全に抑えられ、より完全なオリゴヌクレオチドが合成されることを見出して、この発明を完成させた。

【0013】以下、この発明の実施の形態について詳しく説明する。

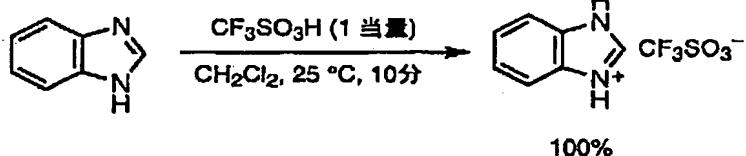
【0014】

【発明の実施の形態】この発明のイミダゾリウムトリフラーートは、例えば後述の実施例1にその調製例を示したように、イミダゾールとトリフルオロメタンスルホン酸をジクロロメタン中、1:1当量に混合することによって調製することができる。このようにして得られたイミダゾリウムトリフラーートは、実施例1にも示したように、吸湿性もなく、通常の使用環境状態で極めて安定であり、容易に取り扱うことができる。

【0015】この発明の化学合成方法においては、上記

のとおりのイミダゾリウムトリフラーートを用いて塩基部無保護ヌクレオシドから塩基部無保護ヌクレオシドホスホロアミダイトを調製し、この塩基部無保護ヌクレオシドホスホロアミダイトを構築単位をして、各々を所定の順番でカップリングすることによって、所定の塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを化学合成する。

【0016】塩基部無保護ヌクレオシドホスホロアミダイトは、例えば、後述の実施例2に例示したように、イミダゾリウムトリフラーートを触媒に用いて塩基部無保護ヌクレオシドをシアノエチルビスアミダイトと反応させることによって調製することができる。この場合、反応はヌクレオシドの糖部水酸基に選択的に起こるため、DNA合成に使用する4種類のN-無保護ヌクレオシドホスホロアミダイト、すなわち、デオキシアデノシン、デオキシチミジン、デオキシグアノシンおよびチミジンホスホロアミダイトを定量的に得ることができる。



100%

【0020】以下、実施例を示してこの出願の発明についてさらに詳細かつ具体的に説明するが、この発明は以下の例によって限定されるものではない。

【0021】

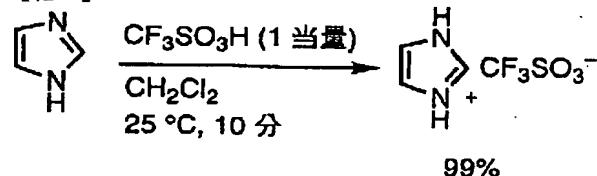
【実施例】

実施例1：イミダゾリウムトリフラーートの調製

以下にその反応式を示したように、イミダゾールとトリフルオロメタンスルホン酸をジクロロメタン中、1:1当量に混合し、25°Cで1.0分間反応させることによって、この発明のイミダゾリウムトリフラーートを調製した。

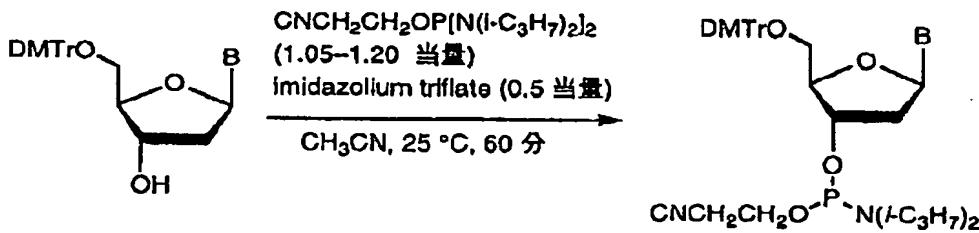
【0022】

【化8】



99%

【0023】得られたイミダゾリウムトリフラーートは、



【0027】この反応によって、表2に示した4種類の

【0017】以上のとおりに得られた4種類のN-無保護ヌクレオシドホスホロアミダイトを構成単位として、公知の固相合成法等により、所望の塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを合成することができる。また、この合成反応は、市販のDNA合成機を用い、そのプロトコールに従って行うこともできる。さらに、この発明の方法では、カップリングした各N-無保護ヌクレオシドホスホロアミダイトを、その都度に、ベンズイミダゾリウムトリフラーートの溶液（例えば、エタノール溶液）で処理するのが好ましい。この処理によって、塩基部アミノ基への副反応は完全に抑えられ、より完成度の高いオリゴヌクレオチドが合成される。

【0018】なお、ベンズイミダゾリウムトリフラーートは、以下の反応式によって合成することができる。

【0019】

【化7】

公知の方法による分析の結果、表1に示したとおりの特性を有していた。

【0024】

【表1】 無色結晶

融点 197-198 °C

元素分析 計算値： C₄H₅F₃N₂O₃S:
C, 22.02; H, 2.31; N, 12.84

実測値： C, 21.96; H, 2.30; N, 12.74

吸湿性なし

【0025】実施例2：塩基部無保護ヌクレオシドホスホロアミダイトの調製

以下にその反応式を示したように、実施例1で得たイミダゾリウムトリフラーートを触媒に用いて塩基部無保護ヌクレオシドをシアノエチルビスアミダイトと反応させた。

【0026】

【化9】

【0027】この反応によって、表2に示した4種類の

ち、デオキシアデノシン、デオキシチミジン、デオキシグアノシンおよびチミジンホスホロアミダイトを各々調製した。表2にも示したように、各ヌクレオシドホスホ

ロアミダイトはほぼ定量的に得られた。

【0028】

【表2】

B:				
yield, %:	96	98	97	99
purity, %:	>98	>98	>96	>99
³¹ P NMR, ppm:	149.0, 149.1	149.2, 149.3	149.1, 149.2	149.0, 149.1

【0029】実施例3: DNA断片の合成

実施例3で得た4種類のN-無保護ヌクレオシドホスホロアミダイトを構成単位として、市販のDNA合成機を用いた固相合成法により、配列番号1に塩基配列を示し

た60量体のDNA断片を合成した。なお、反応サイクルは表3のとおりとした。

【0030】

【表3】

step	operation	reagent (s)	time, min
1	washing	CH ₃ CN	0.50
2	detritylation	3% CCl ₃ COOH/CH ₂ Cl ₂	1.0 x 3
3	washing	CH ₃ CN	2.0
4	coupling	0.1 M amidite /CH ₃ CN + 0.1 M IMT/CH ₃ CN	0.25
5	wait		1.0
6	N-P cleavage	0.3 M BIT/CH ₃ CN	0.50
7	wait		2.0
8	washing	CH ₃ CN	0.50
9	oxidation	1 M t-C ₄ H ₉ OOH/CH ₂ Cl ₂	0.25
10	wait		1.0

BIT = benzimidazolium triflate; IMT = imidazolium triflate

【0031】この合成反応において、図1に示したような鎖長伸長における各ステップ（縮合反応）はほぼ100%で進行し、リン酸部保護60量体が通常収率100%で得られた。この収率は、現在一般的に行われている従来法における60量体の合成収率が20~40%程度であることを考慮すると、極めて高効率であった。さらに、図2に示したように、アンモニア溶液処理(25°C、60分間)によって脱保護および脱離反応を行うこと

によって、無保護DNA60量体が定量的収率で得られた。

【0032】また、得られた無保護DNA60量体の粗抽出物を表4に示した条件からなるで高速液体クロマトグラフィーによって分析したところ、図3に示したように、その純度は95%以上であった。

【0033】

【表4】

分析条件	
カラム	DEAE-2.5μ (250 mm)
流速	0.5 mL/min
温度	25 °C
溶出液	A: 20mM Tris-HCl (pH 9.0) B: A + 1 M NaCl
勾配	A: B (100:0)→(50:50) linear gradient

【0034】

【発明の効果】以上詳しく説明したとおり、この発明の新規化合物であるイミダゾリウムトリフラーートと、この

イミダゾリウムトリフラーートを用いることを特徴とするオリゴヌクレオチド合成法は、以下のとおりの利点を有している。

- (1) 各ステップの縮合收率が100%と高く、また合成プログラムおよび使用する試薬の変更のみで市販の自動DNA合成装置にも適用可能であるため、DNA等の化学合成で一般に要求される50~100量体といった長鎖オリゴヌクレオチドの合成が従来方法の10分の1以下のコストで可能である。
- (2) 不特定のヌクレオシドホスホロアミダイトを使用できるため、適用範囲が広く、実用的である。
- (3) 促進剤として使用するこの発明のイミダゾリウムトリフラーートは吸湿性もなく、安定な化合物であるため、

配列

TATGGGCCTT TTGATAGGAT GCTCACCGAG CAAAACCAAG AACAAACCAGG AGATTTTATT 60

【図面の簡単な説明】

【図1】この発明の方法における各反応ステップの模式図である。

【図2】この発明の方法におけるアンモニア処理に実施

通常使用状態での取り扱いが極めて容易である。

【OO35】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：60

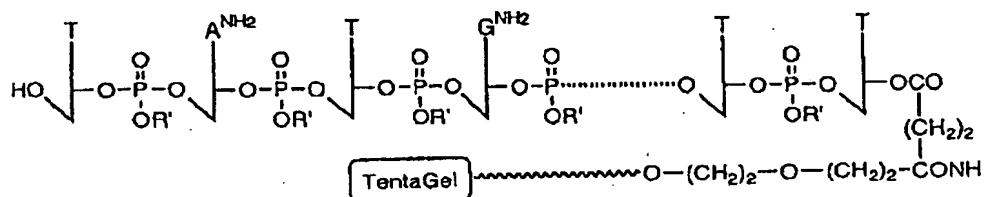
配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

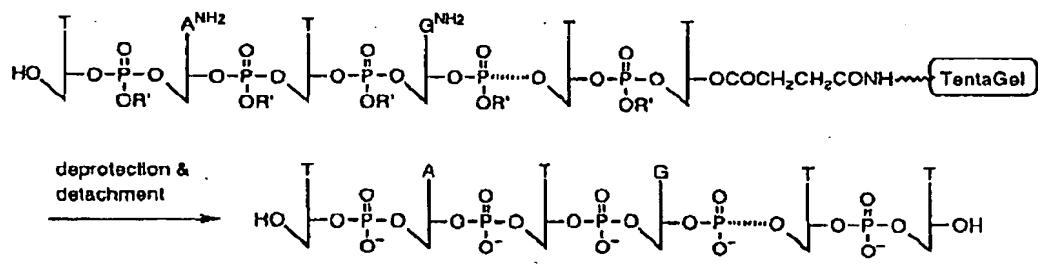
トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

【図1】



【図2】



【図3】

